丁酸梭菌 CBM01 的碳、氮源优化及其对胃肠道耐受性的研究

刘　磊　倪学勤*　曾　东　潘康成　王鹤松　田亚男

（四川农业大学动物医学院，动物微生态研究中心，成都 611130）

摘　要：本试验旨在探究丁酸梭菌CBM01的最佳碳、氮源及其对胃肠道的耐受性。采用控制变量的方法，以梭菌增菌培养基为基础，对丁酸梭菌CBM01的碳、氮源进行优化，同时对其胃肠道耐受性进行研究。结果显示：1）丁酸梭菌CBM01的最佳碳源和最佳氮源分别为葡萄糖和蛋白胨；2）丁酸梭菌CBM01在人工胃液和人工肠液中作用3 h后，存活率分别为90.33％和92.09％；3）丁酸梭菌CBM01可耐受的最高胆盐浓度为0.40%。由此可见，丁酸梭菌CBM01对胃肠道环境具有良好的耐受性，是一株开发潜力巨大、应用前景广阔的益生菌。

关键词：丁酸梭菌；碳源；氮源；耐胆盐；人工胃液；人工肠液

中图分类号：S811.6　　　　　文献标志码：　　　　　文章编号：

益生菌，亦称益生素、活菌制剂、微生态制剂等，是指摄入一定量后能起到促进宿主健康功效的一类活的微生物。益生菌为纯生物制品，具有绿色、无残留、无耐药性等特点[1]；益生菌作为饲料添加剂使用可降低饲料中的抗营养因子，提高饲料利用率[2]，当动物摄入后能调节肠道微生态平衡，增强机体免疫力，提高动物生产性能[3-4]，从而给养殖户创造巨大的经济效益。丁酸梭菌，也称宫入菌、酪酸梭菌，它是硬壁菌门、梭菌纲、梭菌目、梭菌科、梭菌属的一种革兰氏阳性菌，普遍存在于正常人和动物的肠道中。已有的研究证明了丁酸梭菌的急性经口毒性试验和艾姆斯试验均呈安全性[5]，且因其能形成芽孢而具有很强的抗逆性，能够抵抗饲料加工过程中的高温及胃肠道酸性环境[6]。研究发现，丁酸梭菌具备良好的胃肠道黏附性，可以通过空间占位等作用拮抗鳗弧菌等致病菌[7]，同时代谢产生多种益生物质来增强宿主免疫功能。可见，丁酸梭菌符合益生菌的安全性、功能特性和技术可行性等筛选标准[8]。刘红露等[9]报道了丁酸梭菌 CBM01 能够提高肉鸡生产性能，增强机体抗氧化功能，并改善肠道菌群结构，然而其生物学特性并不清晰。本试验通过对丁酸梭菌 CBM01 的

收稿日期：2016-11-01

基金项目：国家自然科学基金（31672318）

作者简介：刘　磊（1994-），男，四川广元人，本科生，从事动物微生态的研究。E-mail: 1558034850@qq.com

*通信作者：倪学勤，教授，博士生导师，E-mail： xueqinni@foxmail.com

碳、氮源优化与其对胃肠道耐受性研究，以深入了解丁酸梭菌 CBM01，并为其作为一株益生菌的生产与应用提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　试验菌种

丁酸梭菌 CBM01 由四川农业大学动物医学院动物微生态实验室提供。

1.1.2　试验试剂及培养基

人工胃液、人工肠液参照《中国药典》2015版附录项下进行配制。猪胆盐由成都市科龙化工试剂厂提供，$FeSO_4\ 7H_2O$、$CuSO_4\ 5H_2O$购自成都市科龙化工试剂厂，$MnSO_4$购自重庆九龙化学试剂厂。

梭菌增菌培养基(reinforced clostridial medium，RCM)：牛肉膏10 g，葡萄糖5 g，酵母粉10 g，氯化钠5 g，乙酸钠3 g，胰蛋白胨10 g，可溶性淀粉1 g，*L*-半胱氨酸盐酸盐0.15 g，琼脂17 g，蒸馏水1 000 mL，pH 7.0，1×10^5 Pa灭菌30 min。

基础培养基：葡萄糖5 g，磷酸二氢钾6 g，磷酸氢二钾4 g，硫酸铵2 g，硫酸镁0.2 g，柠檬酸钠1 g，蒸馏水1 000 mL，pH 7.2~7.4，1×10^5 Pa灭菌30 min。

淀粉培养基：蛋白胨10 g，氯化钠5 g，牛肉膏5 g，可溶性淀粉2 g，琼脂17 g，蒸馏水1 000 mL，pH 7.2~7.4，1×10^5 Pa灭菌30 min。

牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏3 g，蛋白胨10 g，氯化钠5 g，琼脂17 g，蒸馏水1 000 mL，pH 7.2~7.4，1×10^5 Pa灭菌30 min。

1.2　主要仪器设备

灭菌锅（Hirayama，HVE-50）、电子天平（Sartorius，BS-224S）、厌氧培养箱（Thermo Scientific，1 029）、紫外分光光度计（Thermo Fisher Scientific，BioMate-3S）。

1.3　试验方法

1.3.1　丁酸梭菌CBM01的活化

准备活化菌种的前2天打开混合气体（CO_2、H_2、N_2），使厌氧培养箱里面充满混合气体达到严格厌氧的状态。将冻干保存的菌种在厌氧培养箱里用生理盐水稀释后接种于固体RCM，连续传代2次后，再接种于液体RCM中以富集丁酸梭菌CBM01。将活化好的菌种分

装，石蜡封顶，置于4 ℃冰箱保存，待用。

1.3.2　丁酸梭菌CBM01生长曲线的测定

将活化的丁酸梭菌CBM01以1%的比例接种于液体RCM，置36 ℃厌氧培养箱（5% CO_2、10% H_2、85% N_2）中培养48 h，每隔4 h取出3支测定其吸光度（OD）$_{600\ nm}$值，绘制菌株的生长曲线。

1.3.3　丁酸梭菌CBM01在不同培养基上的生长情况

将活化的丁酸梭菌CBM01分别接种到基础培养基、RCM、淀粉培养基和牛肉膏蛋白胨培养基上，36 ℃厌氧培养24 h，统计培养基中丁酸梭菌CBM01的生长情况。

1.3.4　丁酸梭菌 CBM01 的碳源优化试验

选用质量浓度为 2%的乳糖、果糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖和麦芽糖分别替换 RCM 中的碳源（葡萄糖和可溶性淀粉），然后接种丁酸梭菌 CBM01，36 ℃厌氧培养 24 h，采用血球计数板法计数。

1.3.5　丁酸梭菌CBM01的氮源优化试验

分别选取2%的牛肉膏、蛋白胨、尿素、硫酸铵和硝酸钠替换RCM中的氮源（牛肉膏和胰蛋白胨），再接种丁酸梭菌CBM01，36 ℃厌氧培养24 h后血球计数板法计数。

1.3.6　丁酸梭菌 CBM01 的胆盐耐受性试验

分别在质量浓度为 0.30%、0.40%和 0.50%猪胆盐的液体 RCM 中接种 1%的丁酸梭菌 CBM01，每个浓度 3 个重复，置厌氧培养箱内培养 24 h，观察丁酸梭菌 CBM01 的生长情况。

1.3.7　丁酸梭菌 CBM01 的胃肠道耐受性试验

将培养至 48 h 的丁酸梭菌 CBM01 分别接种于人工胃液和人工肠液中，36 ℃恒温厌氧培养，每小时各取出 3 只试管测定其活菌数，共测定 3 h。取其平均值，计算存活率。

2　结果与分析

2.1　丁酸梭菌 CBM01 的生长曲线

以丁酸梭菌 CBM01 的培养时间为横坐标轴，$OD_{600\ nm}$ 值为纵坐标轴，绘制其生长曲线。如图 1 所示，丁酸梭菌 CBM01 的延滞期为 4 h；4 h 后进入对数生长期，该时期的细菌数量呈指数增长，测得 $OD_{600\ nm}$ 值呈线性上升；12 h 后则进入稳定期，此时期活菌数量最高。

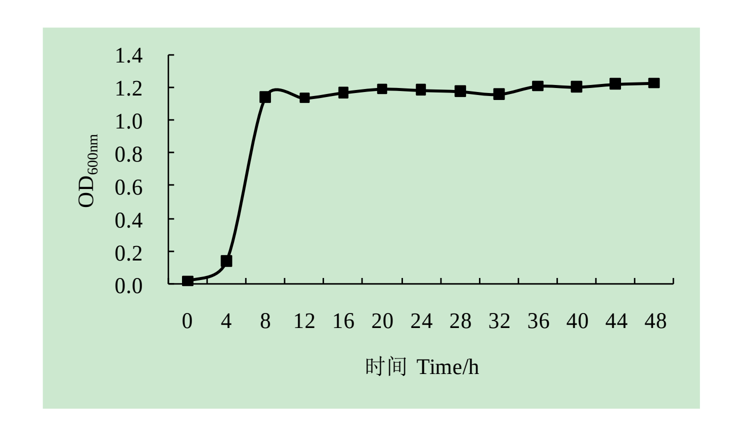


图 1　丁酸梭菌 CBM01 的生长曲线

Fig.1　Growth curve of *Clostridium butyricum* CBM01

2.2　丁酸梭菌 CBM01 在不同培养基上的生长情况

以血球计数板法计数结果或测量培养基上的菌落直径为指标，比较了该菌株在 4 种不同培养基上的生长情况，结果见表 1。由表 1 可知，丁酸梭菌 CBM01 不能在基础培养基和牛肉膏蛋白胨培养基上生长，但能在 RCM 和淀粉培养基中生长。丁酸梭菌 CBM01 在 RCM 中的生长情况优于其在淀粉培养基上的生长情况，考虑到试验效果，故选用 RCM 来进行后续的试验研究。

表 1　不同培养基对丁酸梭菌 CBM01 生长的影响

Table 1　Effects of different mediums on growth of *Clostridium butyricum* CBM01

培养基 Mediums	生长情况 Growth status	菌体浓度/菌落直径 Cell concentrations/colony diameters
梭菌增菌培养基 Reinforced clostridial medium	+	3.6×10^{8} 个/mL
淀粉培养基 Starch medium	+	（0.18±0.04） cm
基础培养基 Basal medium	-	
牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone medium	-	

+为生长，-为不生长。表2同。

＋ means growth；－ means not growth. The same as Table 2.

2.3　丁酸梭菌 CBM01 最佳碳源的确定

如图 2 所示，丁酸梭菌 CBM01 能够利用淀粉、蔗糖、乳糖、果糖、葡萄糖和麦芽糖 6 种碳源。可以看出，以葡萄糖作为碳源时培养得到的总细菌数量最高。

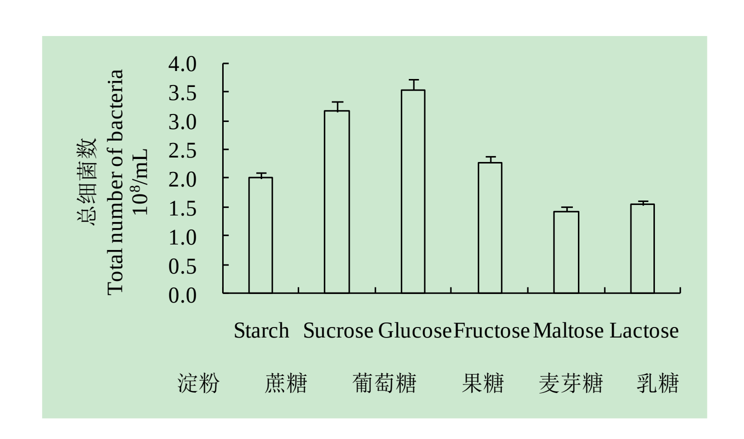


图 2　不同碳源对丁酸梭菌 CBM01 生长的影响

Fig.2　Effects of different carbon sources on growth of *Clostridium butyricum* CBM01

2.4　丁酸梭菌 CBM01 最佳氮源的确定

如图 3 所示，有机氮源中蛋白胨培养该菌株的效果最好，牛肉膏次之；无机氮源中，硫酸铵的效果较硝酸钠好；以尿素为氮源时，得到的总细菌数量为 1.12×10^8 个/mL。

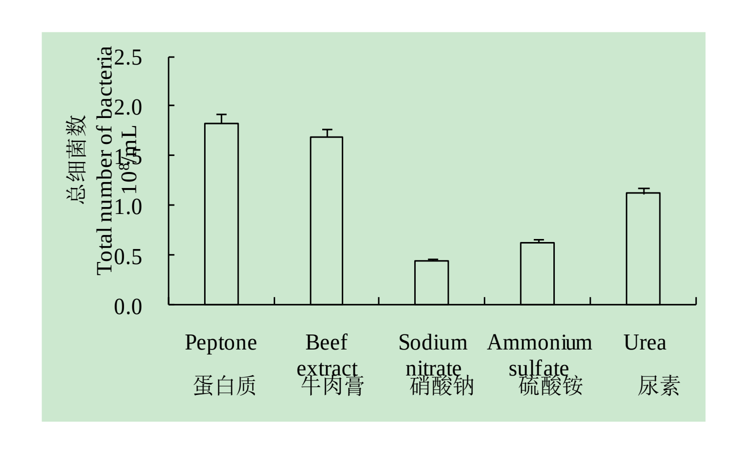


图 3　不同氮源对丁酸梭菌 CBM01 生长的影响

Fig.3　Effects of different nitrogen sources on the growth of *Clostridium butyricum* CBM01

2.5　丁酸梭菌 CBM01 对胆盐的耐受能力

由表 2 可知，丁酸梭菌 CBM01 在 0.30%胆盐的培养基上能生长，在 0.40%胆盐的培养

基上也能生长，但在 0.50%胆盐的培养基上不生长，这表明了丁酸梭菌 CBM01 对胆盐的耐受能力良好，具有很好的应用价值。

表 2　丁酸梭菌 CBM01 对不同浓度胆盐的耐受性

Table 3　Assessment of bile tolerance of *Clostridium butyricum* CBM01 to different bile concentrations

项目 Item	胆盐浓度 Concentration of bile salt		
	0.30%	0.40%	0.50%
生长情况 Growth status	+	+	−

2.6　丁酸梭菌 CBM01 对人工胃液和人工肠液的耐受性

本研究按照《中国药典》的要求配制人工胃液和人工肠液作为模拟人体胃肠道环境，对丁酸梭菌 CBM01 的人工胃液和人工肠液耐受性进行了初步评价，结果如图 4。如图 4 所示，随着时间的延长，丁酸梭菌 CBM01 在人工胃液和人工肠液中的存活率逐步降低：丁酸梭菌 CBM01 在人工胃液和人工肠液中作用 3 h 后存活率分别为 90.33%和 92.09%。

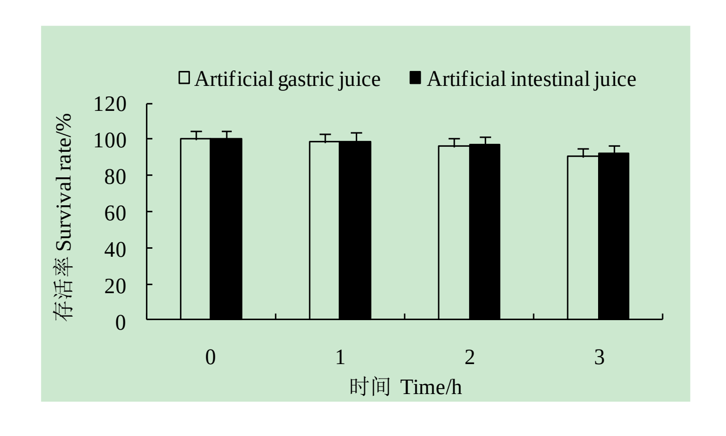


图 4　丁酸梭菌 CBM01 对人工胃液和人工肠液的耐受能力

Fig.4　Tolerance of *Clostridium butyricum* CBM01 in artificial gastric juice and artificial intestinal juice

3　讨　论

作为动物益生菌制剂，丁酸梭菌早已在日本和韩国被广泛地用作畜禽饲料添加剂[8,10]。丁酸梭菌为严格的厌氧菌[11]，培养难度较大，同时受技术和设备的限制，所以我国对丁酸

梭菌的研究起步较晚。丁酸梭菌作为芽孢类益生菌，具有很好的开发前景和应用价值，因此受到了广泛地关注与研究。大量的研究和报道证实了丁酸梭菌良好的益生作用[12-15]，故此我国于 2009 年批准丁酸梭菌为新饲料添加剂，并在 2013 版《饲料添加剂品种目录》中规定了其适用范围[16]。

3.1　丁酸梭菌 CBM01 的生长曲线绘制

本试验通过测定培养液的 $OD_{600\ nm}$ 绘制丁酸梭菌 CBM01 的生长曲线（图 1）。丁酸梭菌 CBM01 的延滞期约为 4 h，表明它能够快速地适应环境；4~12 h 为对数生长期，12 h 以后进入稳定期，此时细菌数量达到峰值。除此之外，我们发现丁酸梭菌 CBM01 的生长曲线与丁酸梭菌 JMY1[17]的生长曲线较为相似。由丁酸梭菌 CBM01 在不同培养基上的生长情况，分析该菌株不能在基础培养基和牛肉膏蛋白胨培养基上生长的原因可能是未提供生长需要的碳氮源或生长因子[18]。

3.2　丁酸梭菌 CBM01 的最佳碳源和最佳氮源筛选

研究微生物的前提是分离得到单个细菌并能将它连续培养。本试验通过单因素多变量的研究方法，对培养丁酸梭菌 CBM01 所需的最佳碳源和最佳氮源进行了筛选。当以葡萄糖为碳源、蛋白胨为氮源时，得到的总细菌数量最高，同时综合性价比可虑，碳源中葡萄糖的价格最低，氮源中蛋白胨的价格虽然较高，但是其试验效果最好，因此确定丁酸梭菌 CBM01 的最佳碳源和最佳氮源分别为葡萄糖和蛋白胨。丁酸梭菌 CBM01 的最佳碳源与戚薇等[19]优化的碳源结果一致，与宋会仪[20]的结果不同；优化得到丁酸梭菌 CBM01 的最佳氮源为蛋白胨，这与赵旭冬[21]的研究报道一致，与姜芳芳等[22]对丁酸梭菌 C.L24 的优化结果不同，造成此现象的原因可能是由于菌株之间的特异性。

3.3　丁酸梭菌 CBM01 对胆盐和人工胃、肠液的耐受性研究

随着抗生素作为饲料添加剂使用弊端的不断显现，世界各国相继颁发了一系列法律以限制或禁止抗生素在动物饲料中的使用[23]，而作为理想的抗生素替代品——益生菌，受到了广大从业人员的青睐。众所周知，益生菌必须具有良好的耐酸和耐胆盐能力，这样才能使其进入消化道内保持一定的活菌数量以发挥作用。丁酸梭菌 CBM01 对胆盐的耐受性较丁酸梭菌 ZJU-F1[10]的好，能在 0.40%的培养基上存活生长，而肠道中胆盐浓度一般不超过 0.30%，暗示了丁酸梭菌 CBM01 进入肠道后可迅速定植并发挥功效。另外，丁酸梭菌 CBM01 对人

工胃、肠液也具有较好的耐受能力，这可能与芽孢杆菌在生长后期形成的芽孢有关。上述结果表明丁酸梭菌 CBM01 具有优良的生物学特性，可用于微生态制剂或生物饲料进一步的开发与应用。

4　结　论

丁酸梭菌 CBM01 的最佳碳源为葡萄糖，最佳氮源为蛋白胨；该菌株对胆盐和人工胃、肠液均有良好的耐受性，能在胃肠道环境中存活较长时间。综上所述，丁酸梭菌 CBM01 具有优良的生物学特性，是一株理想的潜在益生菌。

参考文献：

[1] 王金合.微生态饲料添加剂及其在畜禽生产中的应用研究现状[J].畜牧与饲料科学,2009,30(2):36–38.

[2] SUPRIYATI,HARYATI T,SUSANTI T,et al.Nutritional value of rice bran fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* and humic substances and its utilization as a feed ingredient for broiler chickens[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2015,28(2):231–238.

[3] ZHOU X J,JIN E H,LI S H,et al.Effects of dietary supplementation of probiotics (*Bacillus subtilis*,*Bacillus licheniformis*,and *Bacillus natto*) on broiler muscle development and meat quality[J].Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,2015,39(2):203–210.

[4] LATESH K,SINGH P K,CHANDRAMONI K M.Effect of dietary supplementation of combination of probiotics on the growth performance and immune response of broiler chickens[J].Animal Nutrition and Feed Technology,2013,13(1):15–25.

[5] KONG Q,HE G Q,JIA J L,et al.Oral administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in mice[J].Current Microbiology,2011,62(2):512–517.

[6] 熊祖明,袁杰利.酪酸梭菌的研究与应用进展[J].中国微生态学杂志,2011,23(12):1143–1145.

[7] 宋增福,吴天星,潘晓东.丁酸梭菌对肠道上皮细胞黏附及对鳗弧菌抑制的研究[J].中国兽药杂志,2006,40(8):9–12.

[8] 李雄彪,马庆英,崔云龙.酪酸梭菌:肠道健康的卫士[M].上海:复旦大学出版社,2008:42–44.

[9] 刘红露,范磊,戴茜茜,等.面包酵母硒与酪酸梭菌制剂对肉鸡生长、抗氧化和肠道菌群的

影响[J].浙江农业学报,2015,27(9):1529–1534.

[10] 王腾浩.新型丁酸梭菌筛选及其对断奶仔猪生长性能和肠道功能影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2015:15–16.

[11] CHEN X,SUN Y Q,XIU Z L,et al.Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria[J].International Journal of Hydrogen Energy,2006,31(4):539–549.

[12] 刘亭婷,滑静,王晓霞,等.丁酸梭菌对蛋用仔公鸡肠道菌群、形态结构及黏膜免疫相关细胞的影响[J].动物营养学报,2012,24(11):2210–2221.

[13] WOO T D H,OKA K,TAKAHASHI M,et al.Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile in vitro* by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain[J].Journal of Medical Microbiology,2011,60(11):1617–1625.

[14] ZHANG B,YANG X,GUO Y,et al.Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on serum lipids and lipid-related gene expression in broiler chickens[J].Animal,2011,5(12):1909–1915.

[15] SHINNOH M,HORINAKA M,YASUDA T,et al.*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8[J].International Journal of Oncology,2013,42(3):903–911.

[16] 农业部畜牧业司.中华人民共和国农业部公告第 2045 号[EB/OL].(2013-12-30)[2016-10-23].http://www.moa.gov.cn/zwllm/tzgg/gg/201401/t20140103_3730193.htm.

[17] 杨金梅,张德纯,刘明方,等.正常人粪便中酪酸梭菌的分离与分子鉴定[J].中国微生态学杂志,2013,25(9):1032–1035,1039.

[18] 施曼玲,戴赟,章玲.丁酸梭菌培养条件的研究[J].杭州师范大学学报:自然科学版,2001,18(4):38–40.

[19] 戚薇,何玉慧,李安东,等.酪酸梭状芽孢杆菌发酵培养基的优化[J].天津科技大学学报,2010,25(2):18–21.

[20] 宋会仪.丁酸梭菌发酵条件的优化及其对美国红鱼免疫指标的影响[D].硕士学位论文.杭州:浙江大学,2007:29–30.

[21] 赵旭冬.丁酸梭菌清液发酵和处理工艺[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2011:31–34.

[22] 姜芳芳,李圣杰,丁轲,等.丁酸梭菌 C.L24 蛋白酶产酶条件的优化[J].家畜生态学报,2016,37(1):63–67.

[23] KUMAR R R,LEE J T,CHO J Y.Fate,occurrence,and toxicity of veterinary antibiotics in environment[J].Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,2012,55(6):701–709.

Optimization of Carbon and Nitrogen Sources of *Clostridium butyricum* CBM01 and Its Tolerance to Gastrointerestinal Tract

LIU Lei　NI Xueqin*　ZENG Dong　PAN Kangcheng　WANG Hesong　TIAN Ya'nan

（*Animal Microecology Institute, College of Veterinary, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130, *China*）

Abstract: This experiment was conducted to investigate the optimal carbon and nitrogen source of *Clostridium butyricum* CBM01 and its tolerance to gastrointestinal tract. The reinforced clostridial medium （RCM） was used to optimize the carbon and nitrogen sources of *Clostridium butyricum* CBM01 with the method of controlling variables, and the tolerance of *Clostridium butyricum* CBM01 to gastrointestinal tract was also determined. The results showed as follows: 1） the best carbon source was glucose and the best nitrogen source was peptone for *Clostridium butyricum* CBM01; 2） the survival rates of of *Clostridium butyricum* CBM01 in the artificial gastric juice and artificial intestinal juice for 3 h were at 90.33% and 92.09%, respectively; 3） the highest tolerable concentration of *Clostridium butyricum* CBM01 to bile salt was 0.40%. Altogether, as *Clostridium butyricum* CBM01 exerts great characteristics to tolerate gastrointestinal environments it can be considered as an ideal potential probiotic strain for further researching.

---

*Corresponding author, professor, E-mail： xueqinni@foxmail.com　（责任编辑　武海龙）

Key words: *Clostridium butyricum*; carbon sources; nitrogen sources; tolerance of bile salt; artificial gastric juice; artificial intestinal juice